

Zadanie 72 Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikowy układ krzyżowań.

W roku 2016 w ramach tego Zadania realizowano 3 tematy badawcze:

Temat badawczy 1

Wstępna ocena cech fenotypowych 2100 siewek w doświadczeniu, w warunkach polowych oraz ocena poziomu ploidalności 12 form rodzicielskich i wybranych mieszańców borówki wysokiej przy użyciu cytometrii przepływowej

Celem tego tematu badawczego była ocena siewek pokolenia F₁ borówki wysokiej pod względem siły wzrostu roślin w doświadczeniu polowym. Drugim celem badań było ustalenie poziomu ploidalności 12 genotypów rodzicielskich borówki wysokiej i wytypowanych siewek (mieszańców) pochodzących z programu krzyżowań. Materiał roślinny stanowiło 2.100 siewek, posadzonych w doświadczeniu założonym na polu w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach jesienią 2014 roku. Ponadto materiałem roślinnym były krzewy 12 odmian rodzicielskich (7 form męskich – ‘Aurora’, ‘Bluecrop’, ‘Brigitta Blue’, ‘Chandler’, ‘Draper’, ‘Duke’ i ‘Northland’ oraz 5 form żeńskich – ‘Earliblue’, ‘KazPliszka’, ‘Polaris’, ‘Toro’ i ‘Weymouth’), które użyto w programie krzyżowań, w układzie czynnikowym (7 x 5) wiosną w latach 2014-2015 oraz 100 mieszańców z populacji siewek borówki. W 2016 roku wykonano wstępną ocenę siły wzrostu siewek w dwóch terminach: wiosną (pocz. maja) i jesienią (II poł. października), wykorzystując dwie metody: skala bonitacyjna (1-9) i miar wysokości (cm). Ocenę poziomu ploidalności wykonano cytometrycznie przy użyciu cytometru przepływowego (CyFlow PA, Partec, Niemcy, z lampą UV LED 365 nm). Do analizy cytometrycznej (FCM) wykorzystano próby 3-4 najmłodszych liści. Do ekstrakcji i barwienia jąder użyto buforu Partec z dodatkiem 1% PVP, zawierającego barwnik fluorescencyjny DAPI. Poziom ploidalności określano na podstawie histogramów. Wykorzystano standardy zewnętrzne: diploidalny gatunek borówki czarnej (*V. myrtillus*, 2n=2x=24) i tetraploidalną odmianę borówki wysokiej ‘Bluecrop’ (2n=4x=48).

Młode siewki borówki wysokiej, należące do 35 rodzin mieszańcowych, charakteryzowały się dość słabym lub średnio silnym wzrostem. Wyniki oceny bonitacyjnej i pomiar wysokości siewek były silnie, pozytywnie skorelowane ze sobą. Po uśrednieniu wyników oceny tej cechy okazało się, że najsilniejszym wzrostem charakteryzowały się siewki należące do ośmiu rodzin mieszańcowych: ‘Aurora’ x ‘Toro’, ‘Bluecrop’ x ‘Earliblue’, ‘Bluecrop’ x ‘Toro’, ‘Brigitta Blue’ x ‘Earliblue’, ‘Chandler’ x ‘Earliblue’, ‘Duke’ x ‘KazPliszka’, ‘Duke’ x ‘Polaris’ i ‘Northland’ x ‘Weymouth’. Uzyskane wstępne wyniki badań nad oceną poziomu ploidalności na podstawie histogramów analizy cytometrycznej wskazują, że wszystkie genotypy rodzicielskie i zdecydowana większość analizowanych mieszańców borówki wysokiej okazały się tetraploidami (2n=4x=48). Dla 6 siewek w kolejnych analizach cytometrycznych uzyskiwano powtarzalne histogramy wskazujące na ich aneuploidalność.

Temat badawczy 2

Określenie warunków inicjacji i stabilizacji kultur *in vitro* 10 genotypów borówki wysokiej: sposobu odkażania, składu pożywki inicjalnej oraz określenie stopnia wewnętrznej czystości mikrobiologicznej poszczególnych genotypów

Celem badań była optymalizacja warunków *in vitro* do inicjacji i stabilizacji 10 genotypów borówki wysokiej i ocena stopnia czystości od bakterii endogennych poszczególnych genotypów. Materiał badawczy stanowiło 10 genotypów borówki wysokiej: 5 wybranych odmian rodzicielskich (‘Duke’, ‘Bluecrop’, ‘Chandler’, ‘KazPliszka’ i ‘Polaris’) i 5 mieszańców (siewek) oznaczonych numerami: 30, 48, 57, 58, 69, uzyskanych z programu krzyżowań. Materiał inicjalny stanowiły tegoroczne pędy pobierane od maja do lipca. Pąki inicjalne wierzchołkowe i kątowe płukano pod bieżącą wodą oraz w roztworze detergentu. Sprawdzano dwa sposoby odkażania powierzchniowego: w 0,1% roztworze chlorku rtęci oraz w 2,0% roztworze chloraminy. Zastosowano dwie pożywki inicjalne o składzie: ½ soli

WPM i ½ soli wg. Andersona, 5 mg/l 2iP, 30g/l sacharozy, agar Bacto. Na tych pożywkach eksplantaty pozostały 6 tygodni w fitotronie, w temperaturze 23-25°C, w świetle rozproszonym. Z eksplantatów inicjalnych pobierano dolne fragmenty pędów i wykładano na pożywkę bakteryjną, na której po 10 dniach oceniano obecność bakterii endogennych. Następnie eksplantaty przenoszono na pożywki do stabilizacji kultur o składzie: sole WPM lub wg. Andersona, 5 mg/l 2iP, 30g/l sacharozy, agar Bacto.

Wstępne wyniki wskazują, że inicjacja borówki wysokiej do warunków *in vitro* jest trudna i długotrwała. Proces trwał 6 miesięcy i obejmował okres inicjacji i stabilizacji kultur. Wpływ poszczególnych czynników był zależny od genotypu i zdolności do podejmowania wzrostu. Podczas inicjacji kultur wypadły na skutek uszkodzeń i zakażeń powierzchniowych u niektórych genotypów, wynosiły ok. 70%. Najtrudniej było zainicjować kultury *in vitro* u odmian: 'Duke', 'Bluecrop', 'Chandler' i siewki 69, a łatwiej u odmiany 'KazPliszka' oraz siewek 30 i 58. Jednym z powodów licznych strat podczas stabilizacji kultur była obecność bakterii endogennych, które wykryto u wszystkich badanych genotypów. Nie odnotowano wpływu pożywki na przeżywanie eksplantatów w okresie inicjacji i stabilizacji kultur badanych genotypów borówki wysokiej.

Temat badawczy 3


Estymacja zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) oraz określenie współczynników odziedziczalności i korelacji genetycznej dla ocenianych cech biologicznych

Celem badań było określenie zdolności kombinacyjnej wybranych odmian rodzicielskich borówki wysokiej w oparciu o ogólną i specyficzną zdolność kombinacyjną (GCA i SCA) dla wybranych cech użytkowych. Materiałem roślinnym była populacja mieszańców (2.100 siewek) borówki wysokiej rosnących w metodycznym doświadczeniu. W sezonie wegetacyjnym 2016 roku wykonano wstępną ocenę siły wzrostu siewek, w dwóch terminach (wiosną i jesienią) i przy wykorzystaniu dwóch metod (skala bonitacyjna i pomiar roślin). Zebrane dane z doświadczenia poddano analizie statystycznej w dwóch etapach: średnie z pomiarów opracowano metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), estymację efektów GCA i SCA, analizę wariancji i szczegółowe testowanie jednoczesne wykonano za pomocą programu komputerowego SERGEN (opracowany przez naukowców z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu).

Wstępne wyniki badań i analizy statystycznej pokazują, że badane genotypy rodzicielskie borówki wysokiej różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem siły wzrostu siewek. Oszacowane efekty GCA i SCA 12 form rodzicielskich i 35 rodzin mieszańcowych przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Pozytywne i istotne wartości efektów GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmian: 'Bluecrop', 'Duke' i 'Earliblue'. Oznacza to, że badane odmiany użyte w krzyżowaniach mogą przyczynić się do poprawy siły wzrostu u potomstwa siewek. Odmiany 'Aurora' i 'Brigitta Blue' miały istotne negatywne efekty GCA dla tej cechy. Obie odmiany użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących słabą siłę wzrostu u potomstwa siewek. Istotnie pozytywne efekty SCA uzyskano dla 6 rodzin mieszańców: 'Aurora' x 'Toro', 'Chandler' x 'Earliblue', 'Northland' x 'Weymouth', 'Bluecrop' x 'Toro', 'Draper' x 'KazPliszka' i 'Duke' x 'Polaris'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje silny wzrost roślin. Istotnie negatywne efekty SCA dla tej cechy uzyskano dla 5 rodzin mieszańcowych: 'Aurora' x 'Earliblue', 'Draper' x 'Earliblue', 'Brigitta Blue' x 'Weymouth', 'Chandler' x 'Toro', i 'Northland' x 'Toro'. Mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się słabą siłą wzrostu.

Poster prezentowany podczas Międzynarodowej Konferencji „European Congress on Biotechnology”, Kraków, Polska, lipiec 3-6, 2016, uwzględnia wyniki oceny poziomu ploidalności 12 genotypów rodzicielskich borówki wysokiej i 100 wytypowanych siewek (mieszkańców), pochodzących z programu krzyżowań z roku 2016 (Temat badawczy 1 – Sprawozdanie za rok 2016, str. 3-11)

Podwyszyńska M., Pluta S. 2016. Ploidy level evaluation of highbush blueberry parental genotypes and their hybrids. *New Biotechnology* 33: S 164






Inhort
SKIERNIEWICE

Institute of Horticulture
Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice, Poland

Małgorzata Podwyszyńska
Stanisław Pluta
Stanislaw.Pluta@inhort.pl

Ploidy level evaluation of high blueberry parental genotypes and their hybrids







Introduction

Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is grown in Poland on commercial scale recently. In 2015, growing acreage of this crop amounted to 6.9 thousand ha, and the fruit production was approximately 13.0 thousand metric tons. With this level of blueberry production, Poland currently ranks first in Europe and fifth in the world. Blueberry fruits are considered extremely dessert and contain numerous compounds with high nutritional and health-beneficial values. Due to the high interest in new cultivars of this species, the Research Institute of Horticulture in Skierniewice started the new blueberry breeding program in 2009. Among the wild species of *Vaccinium corymbosum*, there are mainly tetraploids (4x), some diploids (2x) and hexaploids (6x) as well as their interploidy hybrids - triploids (3x) and pentaploids (5x). This species is known to produce a small amount of unreduced gametes 2n that sometimes leads to the formation of triploids from diploid parents or pentaploids of tetraploid parents. However, it is believed that the most of highbush blueberry cultivars are tetraploids, but pentaploids and diploids are also known. It is well known that in tetraploids of many various plant species, meiosis is impaired, and gametes with variable chromosome number may occur. Then, if there is a formation of hybrid, it can be an aneuploid or a polyploid with another ploidy level than parental forms. The ploidy level can affect fertility of parental genotypes as well as fruit and seed formation at hybridization. However, except of three cultivars which are known to be tetraploids, the ploidy level of other parental genotypes selected for our breeding program has been unknown. In our previous study, we evaluated of crossing potential of 12 genotypes of highbush blueberry after planned program pollination. We have observed low seed formation in some crosses.

The aim of the present study was to elucidate whether the cause of poor seed production could be the variation in ploidy levels of parental cultivars


Evaluation of the feasibility of crossing 12 genotypes of highbush blueberry after planned program pollination







Preparation of parental highbush blueberry forms for pollination and the implementation of the planned combination of 35 crosses in a factorial layout (7 x 5)

Crossing design (7 x 5)

Maternal forms ()	Paternal forms ()				
	Earliblue	Pilziska	Polaris	Toro	Weymouth
Aurora	X	X	X	X	X
Bluecrop	X	X	X	X	X
Bright Blue	X	X	X	X	X
Chandler	X	X	X	X	X
Draper	X	X	X	X	X
Duke	X	X	X	X	X
Northland	X	X	X	X	X



The steps of crossing parental forms of highbush blueberry

A – flower buds ready for emasculation
B – pollination
C – covering with isolators
D – fruits of cross pollinations
E – seed from cross pollinations
F – young seedlings

Material and Methods

Material



Twelve parental genotypes and 250 selected seedlings (hybrids) obtained from the highbush blueberry crossing (6-10 seedlings from each OF 35 crosses) have been used for our studies. Among the parental genotypes, seven maternal forms () - 'Aurora', 'Bluecrop', 'Bright Blue', 'Chandler', 'Draper', 'Duke' and 'Northland' and five paternal forms () - 'Earliblue', 'KazPilziska', 'Polaris', 'Toro' and 'Weymouth' were used for the factorial (7x5) crossing design. Parental genotypes are characterized by many valuable features and high genetic and phenotypic variability as well as different geographical origin.

Ploidy evaluation

Assessment of the ploidy level was performed by the flow cytometry. Samples, the second, third and fourth youngest leaves were taken from the shoot tips. Leaf tissue (0.5–1 cm²) was chopped in a Petri dish in 0.5 mL nuclei isolation Partec buffer with 1% PVP to which DAPI (50 µg/mL) was added (Sivakova 2008). After adding 1 mL of the isolation buffer, the samples were filtered through a 30µm filter and incubated for 45-60 min. in darkness at room temperature. The fluorescence of the nuclei was measured using CyFlow Ploidy Analyser with CyView software (CyFlow PA, Partec, Germany) with UV-LED 365 nm. Data were analyzed by means of CyView software (Partec). Samples with at least 1000 nuclei were measured. Each plant was analyzed three times.

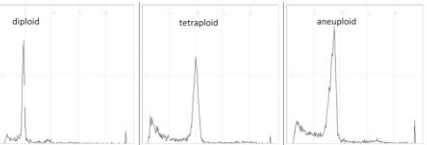
High blueberry parental genotypes

Cultivar	Country of origin	Growth intensity	Ripening time	Yielding	Fruit size	Survivability to diseases
1. Aurora	USA	moderate	very late	high	medium	moderate
2. Bluecrop	N Zealand	high	mid-season	high	large	moderate
3. Bright Blue	USA	moderate	late	moderate	medium	low
4. Chandler	USA	low	mid-season	moderate	very large	moderate
5. Draper	USA	moderate	mid-season	high	large	moderate
6. Duke	USA	high	early	moderate	large	moderate
7. Northland	USA	high	early	moderate	medium	low
Paternal forms						
1. Earliblue	USA	high	early	moderate	medium	moderate
2. Pilziska	Poland	low	very early	moderate	small	low
3. Polaris	USA	moderate	early	high	medium	moderate
4. Toro	USA	moderate	mid-season	high	large	moderate
5. Weymouth	USA	high	early	moderate	medium	low


Results

Cytometric analysis has shown that all the parental cultivars are tetraploids. In case of their hybrids, except of six aneuploids, all other seedlings have been proven to be tetraploids. Phenotypically aneuploids differ markedly from other seedlings. Since our results demonstrate that all the parental genotypes of *V. corymbosum* are tetraploids, other causative agent of poor seed production in some crosses should be considered.



Histograms of relative nucleus DNA content of nuclei isolated from young leaves of diploid standard *Vaccinium myrtillus* L., and tetraploid *Vaccinium corymbosum* L. (maternal form cv. ... and its seedling [...])

This work was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development (Biological progress – basic research, task 70/2015)



INSTYTUT OGRONICTWA
96-100 Skierniewice, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3

www.inhort.pl

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych:

Podwyszyńska M., Pluta S. 2016. Ploidy level evaluation of highbush blueberry parental genotypes and their hybrids. *New Biotechnology* 33: S 164

Ploidy level evaluation of highbush blueberry parental genotypes and their hybrids

Podwyszyńska Małgorzata, Pluta Stanisław

Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland

Malgorzata.Podwyszynska@inhort.pl

Ploidy level evaluation of highbush blueberry parental genotypes and their hybrids Poland on commercial scale recently. With the level of blueberry production of 13.0 thousand metric tons in 2015, Poland currently ranks first in Europe and fifth in the world. Due to the high interest in new cultivars, the Research Institute of Horticulture in Skierniewice started the new blueberry breeding program in 2009. It is believed that the most of highbush blueberry cultivars are tetraploids, but pentaploids and diploids are also known. The ploidy level can affect fertility of parental genotypes as well as fruit and seed formation at hybridization. However, except of three cultivars which are known to be tetraploids, the ploidy level of other parental genotypes selected for our breeding program has been unknown. In our previous study we have observed low seed formation in some crosses. The aim of the present study was to elucidate whether the poor seed production could result different ploidy levels of parental cultivars. Twelve parental genotypes (used for the factorial crossing design) and 100 selected seedlings (hybrids) of *V. corymbosum* have been used for our studies. Assessment of the ploidy level was performed by the flow cytometry. Cytometric analysis has shown that all the parental cultivars are tetraploids. In case of their hybrids, except of six aneuploids, all other seedlings have been proven to be tetraploids. Since our results demonstrate that all the parental genotypes of *V. corymbosum* are tetraploids, other causative agent of poor seed production in some crosses should be considered.